

# Reconocimiento y análisis de áreas de superposición de objetos en imágenes de Microscopia

**Sandra Serafino, Rubén S. Wainschenker, Jorge H. Doorn**

INTIA, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional del Centro de la  
Provincia de Buenos Aires

e-mail: [serafino@cibergamo.com](mailto:serafino@cibergamo.com), [{rfw,jdoorn}@exa.unicen.edu.ar](mailto:{rfw,jdoorn}@exa.unicen.edu.ar)

## Resumen

El procesamiento digital de imágenes ha aportado, gracias a los avances científicos y tecnológicos de los últimos años, una gama muy amplia de algoritmos para la captura, representación, clasificación y análisis de objetos, que sin duda han permitido un conocimiento más preciso de las estructuras, comportamientos y/o mecanismos que rigen los procesos vitales. Aún así, la automatización de tareas como la segmentación, o la clasificación de elementos en una imagen siguen siendo un aspecto indiscutido de estudio. La presencia de objetos superpuestos con cierto nivel de transparencia en una imagen representa uno de los problemas con los que los especialistas encargados del análisis de esas imágenes se encuentran a diario. Los conceptos aportados por la microscopia óptica en general y la microscopia confocal en particular, mediante el barrido de planos sucesivos de una muestra, o los cambios de iluminación de un punto en particular de la misma provocada por el enfoque de un área específica, sumado al procesamiento digital de imágenes pueden aportar nuevo conocimiento a este tipo de problemáticas. El objetivo de este proyecto es el estudio y desarrollo de nuevas técnicas de procesamiento digital que permitan mejorar el análisis automatizado de imágenes de microscopia con objetos semitranslúcidos superpuestos en general, y en particular para el caso en que el área de cruce obstruye el reconocimiento de zonas de alta importancia para su interpretación.

## Introducción

El análisis de imágenes en la medicina y en las ciencias biológicas en general, tropieza muy frecuentemente con la superposición de objetos relevantes en la imagen obtenida, de forma tal que el estudio que se está pretendiendo realizar es dificultado en una magnitud que muchas veces depende de la naturaleza de la superposición.

Este fenómeno está presente en el estudio de cultivos bacteriales [1], en imágenes de diverso origen de tejidos [2][3], en estudios de sangre y en

la construcción de cariotipos [4][5], entre muchos otros (ver figura 1).

Este tipo de dificultades ha estado presente desde que se comenzaron a hacer observaciones microscópicas de material biológico y se han ido encontrando en prácticamente cada nueva técnica de obtención de imágenes, tales como la radiografía, y muchas otras.

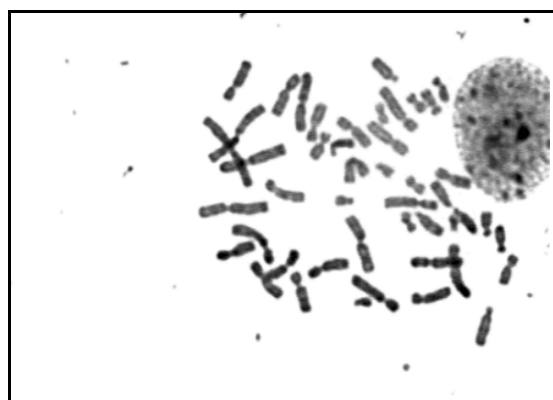


Fig. 1: Metafase con cromosomas superpuestos

El advenimiento de la digitalización y el posterior procesamiento digital de imágenes prácticamente no ha alterado significativamente esta circunstancia en virtud de que en la gran mayoría de los casos el objetivo del procesamiento se restringe a la mejora de la visualización.

Esta perspectiva no es una cuestión menor, ya que no es estrictamente cierto que la mejor imagen para ser vista por el ser humano es también la mejor imagen para ser procesada por un algoritmo computacional.

Es por esto que, desprenderse, aunque sea parcialmente, del paradigma de obtener imágenes para su visualización, puede agregar un grado de libertad significativo a la captura y procesamiento de estas imágenes. Esta es en esencia la hipótesis fundamental de este proyecto, ya que se proponen varios caminos para atacar el problema de superposición de objetos en imágenes de microscopia óptica, que no entronizan la visualización como fin último.

## Captura de imágenes

La captura de la imagen requiere de la preparación de la muestra que se desea observar. Para el caso de la clasificación cromosómica se trabaja en la

etapa de metafase de la división mitótica, mediante la aplicación de alguna técnica de tinción. Si desea observarse el patrón de bandas de los cromosomas para su posterior clasificación de acuerdo con el código ISCN [6], los métodos más comúnmente usados son el bandeo G, R, C, T y Q. Si en cambio no es relevante esta información la técnica de tinción a aplicar dependerá del análisis posterior que se quiera realizar. Cualquiera sea el caso es necesario frenar el desarrollo mitótico en la metafase de forma de permitir la observación de los cromosomas.

Supóngase entonces que se tiene en el portaobjetos de un microscopio una muestra que es el resultado de la aplicación de alguna técnica de tinción, en la que se observan varias superposiciones entre cromosomas de tal manera que el centrómero de varios de ellos resulta indistinguible visualmente e inencontrable con la técnica de procesamiento que se está utilizando. Resulta obvio que si se modifica la fuente de iluminación aumentándola se obtendrán imágenes notoriamente diferentes a la anterior. En la mayoría de los casos estas nuevas imágenes serán poco aptas para la visualización por el ser humano, pero existe la posibilidad de que se genere información más útil para el procesamiento automático de la imagen.

Extendiendo este enfoque, es posible pensar en cambiar la composición cromática de la luz utilizada o eventualmente recurrir a fuentes luminosas cuasi monocromáticas. Obviamente este tipo de imágenes será, al menos, poco utilizable para la visualización; más aún, algunas de éstas no podrán ser enfocadas u observadas visualmente en virtud del riesgo de daño al ojo del observador, que conllevan. Nuevamente la degradación de la calidad visual de la imagen para el ojo humano puede permitir la adquisición de información no disponible con la iluminación utilizada habitualmente.

El apartamiento de la fuente luminosa del eje óptico del microscopio es una técnica que ya ha sido utilizada con gran éxito en varias disciplinas tales como la metalografía y el estudio de superficies [7]. Es imaginable que la superposición de objetos, aún en el contexto de su reducida dimensión pueda ser percibida utilizando fuentes luminosas oblicuas de manera de provocar un juego de sombras cuyo contenido de información es hipotéticamente valioso y cuyo estudio exploratorio es casi mandatorio, especialmente por estar tratando con objetos cuya opacidad, sin ser la de un metal, es suficientemente importante como para dificultar la visión del objeto subyacente.

### **Modelado del microscopio**

Una forma potencial de mejorar la imagen obtenida en el sentido de hacer más evidente la información oculta de la imagen es aprovechar el modelo del microscopio de manera de aplicar a la imagen

obtenida filtros, no ya genéricos, sino específicos del instrumento que dio origen a la imagen.

Las imágenes digitales y su posterior procesamiento dependen en gran medida del medio de captación o adquisición. En el caso de las imágenes de microscopía los parámetros que influyen en este proceso son varios, partiendo de los componentes básicos de un microscopio óptico, y la cámara encargada de la digitalización, o CCD.

El sistema de microscopía se basa en la utilización de una fuente de luz, la que permite mediante la utilización de distintos tipos de lentes y filtros la reproducción del elemento de estudio. La cámara se encarga de convertir la señal analógica en digital.

Sin embargo es posible atacar el problema intentando mejorar la información obtenida del medio de captación de la imagen, desde el propio proceso de adquisición, mediante la aplicación de distintos conceptos involucrados en la metodología de reproducción utilizada por la microscopía óptica, lo que redundaría en la mejora de su posterior procesamiento y análisis.

El Microscopio confocal, es un microscopio óptico que incorpora dos diafragmas (ver Fig. 2): un diafragma de iluminación localizado tras la fuente luminosa denominado Pinhole de Excitación, cuya utilidad es eliminar la luz proveniente de planos superiores e inferiores al plano focal, aumentando con ello la claridad y resolución de la imagen; y un diafragma de detección, de tamaño variable situado delante del fotodetector, denominado Pinhole de Emisión

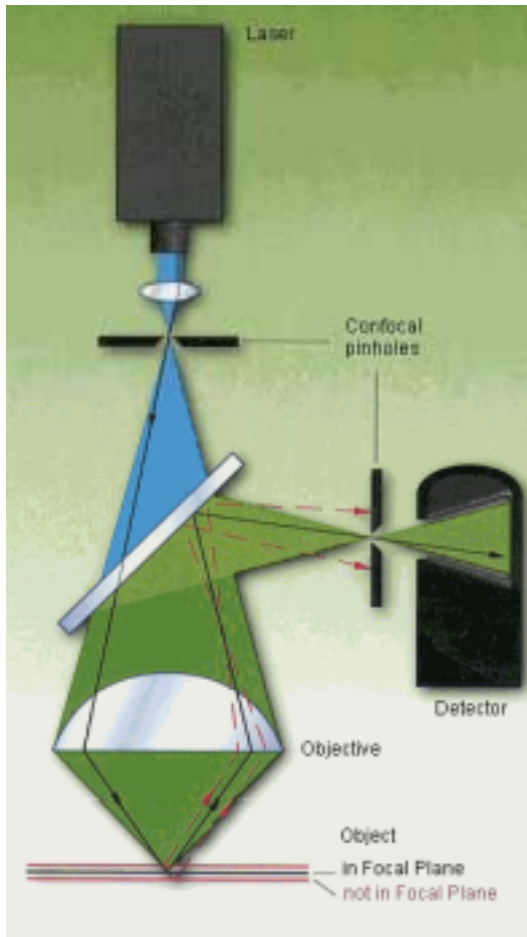


Fig. 2: Diafragmas de iluminación y de detección en un microscopio confocal.

### Generación de información

El proceso de generación de la imagen desde el microscopio involucra en mayor medida a algunos componentes del mismo que influyen directamente en su conformación. La figura 3 muestra la estructura de un microscopio moderno.

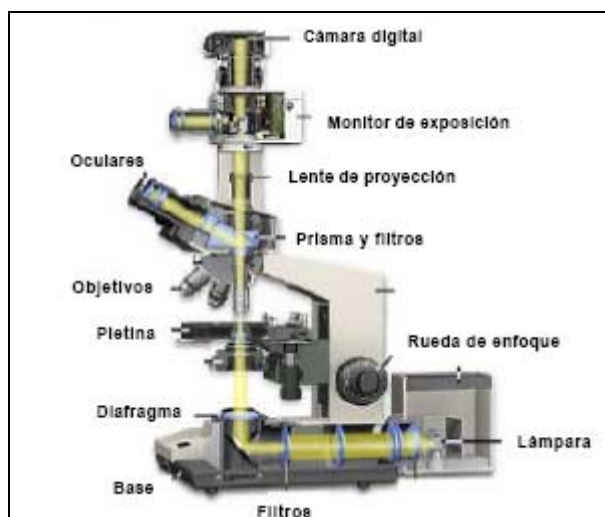


Fig. 3: Estructura general de un microscopio moderno.

Muy básicamente en el proceso de representación mediante el microscopio, la formación de la imagen requiere iluminar el objeto de estudio. El condensador del microscopio es el encargado de condensar la luz de la fuente sobre el objeto motivo de estudio como se ve en la figura 4 cubriendo luego el objetivo.

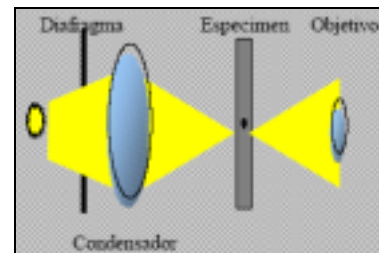


Fig. 4: Condensador de luz sobre el portaobjetos y cubriendo la lente objetivo.

Luego, el objetivo del microscopio es el componente más importante en la generación de la imagen, marcando la resolución y brillo que se quiere obtener de la muestra. Básicamente la resolución se define como la distancia mínima detectable entre dos objetos muy próximos, en base a parámetros como la longitud de onda de la iluminación, el índice de refracción del medio y la apertura angular del objetivo. El brillo o intensidad es una función que depende fundamentalmente del objetivo considerándose en su definición la apertura numérica del mismo y la magnificación. Y por último, los filtros son los que permiten seleccionar el rango de la luz emitida sobre el espécimen y el rango de la luz recibida, pudiendo colocarse en el microscopio o directamente en la cámara. Esta a su vez, es simplemente un conjunto de elementos fotosensores que almacenan la luz que reciben en cierto lapso y la transmiten en forma de señal eléctrica.

En el caso de la microscopia confocal, el proceso barre planos sucesivos de la muestra, produciendo una pila de imágenes, cada una de las cuales constituye una sección óptica; tales secciones vienen a ser imágenes de finos cortes. Los programas de procesamiento de imágenes no sólo registran el brillo de cada zona de cada sección, sino también la ubicación de esa área en la muestra, o sea, su localización en un plano individual (las coordenadas  $x$  e  $y$ ) así como la profundidad de éste (la coordenada  $z$ ). Se preparan con ellos reconstrucciones tridimensionales de objetos microscópicos, permitiendo hacer girar alrededor de un eje las imágenes reconstruidas y observarlas desde otros ángulos. [8]

Sin embargo para construir una imagen es necesario recorrer toda la muestra de manera uniforme,

además de que el rayo de iluminación y la vía de retorno, deberán estar perfectamente alineadas. Esto implica que la mayoría de los instrumentos que hasta ahora se han desarrollado, se basen en complejos sistemas electromecánicos que resultan en un alto costo, ya que tienen que generarse pequeños desplazamientos perfectamente uniformes, e integrarse la imagen en una computadora [9].

## Conclusión

Tal y como ya se ha expresado en el inicio de este trabajo, la existencia de objetos superpuestos en imágenes de microscopía es un problema que abarca a más de un área científica en particular. El procesamiento digital de imágenes ha aportado una gran variedad de técnicas en relación con la mejora en la visualización de las mismas. Pero el desarrollo de trabajos computacional de estos problemas, partiendo desde el propio medio de captación y utilizando los conceptos de la óptica, cuya base es en la que se sustentan los mecanismos naturales de la percepción.

## Referencias

- [1] Martínez J, Lejeune M., Pons Ferré L., Salvadó Usach M., García Rojo M, "Análisis cuantitativo de técnicas inmunohistoquímicas. Mejora de resultados mediante aplicación de software de análisis de imágenes digitales.", *Departamento de Patología, Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Departamento de Patología, Complejo Hospitalario de Ciudad Real, Departamento de Informática del, Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, ESPAÑA.*
- [2] Heredia Rojas L., "Métodos Rápidos Modernos", Depto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Revista de Salud Pública y Nutrición. Edición especial Nro. 5-2004.
- [3] Ríos Figueroa H., "Cuantificación y caracterización morfológica de células por medio de análisis digital de imágenes", LANIA, México.

relacionados con el procesamiento puntual de este tipo de problemáticas no ha tenido la misma relevancia. Y las soluciones computacionales a aplicaciones de diagnóstico, cuantificación y/o clasificación de objetos con estas características se han transformado en semiautomáticas y dependientes del conocimiento del especialista del área de estudio. El paradigma de las mejoras sucesivas a la visualización de la imagen frente a las posibles mejoras en el procesamiento directo de las mismas es un gran desafío.

Se pretende abrir una línea de investigación que permita realizar nuevos aportes a esta temática, focalizando el trabajo en la generación de soluciones que logren un mejor procesamiento

- [4] Massa J., Moreno H., Doorn J., Del Fresno M., "Generación y Análisis de Cariotipos", Tandil, Argentina, 2000.

- [5] Gualdrón González O., Vargas Castellanos C., Sotaquirá Gutiérrez M., Sánchez Noguera J., "Obtención de Cariotipos", Grupo de Óptica y Tratamiento de señales, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, 2003.

- [6] ISCN - Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, "International System for Human Cytogenetic Nomenclature", 1995.

- [7] Restrepo A., Branco J., Gutierrez M., Zapata A., "Método semiautomático para la caracterización del hormigón empleando procesamiento digital de imágenes", Escuela de Sistemas, Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. 2001.

- [8] Lichtman, J., "Microscopía confocal", Scientific American, Edición española, Ciencia en imágenes, p 20-25, 1994.

- [9] Cherniz A., Adur J., Deluca G., Casco V., "Informática aplicada al desarrollo de un Microscopio de Seccionamiento Óptico", Laboratorio de Microscopía, Facultad de Ingeniería – Bioingeniería, UNER, Entre Ríos, 2002.